

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

“Presente y futuro de las técnicas de obtención de ADN embrionario para el diagnóstico genético preimplantacional (PGT).”

Tutora: María Cruz Palomino
Cotutor: David Castro González
Autora: Amaiur Mendizabal Bengoa

Alcobendas, Septiembre 2022

ÍNDICE

RESUMEN	- 0 -
INTRODUCCIÓN	- 1 -
PGT TIPOS E INDICACIONES PRINCIPALES	- 3 -
PGT-A	- 3 -
PGT-M.....	- 3 -
PGT-SR	- 4 -
ANÁLISIS DAFO	- 4 -
TÉCNICAS INVASIVAS.....	- 4 -
Biopsia en día 3 o biopsia de blastómeros.....	- 5 -
Biopsia de trofoectodermo.....	- 8 -
TÉCNICAS NO INVASIVAS.....	- 13 -
Blastocentesis	- 13 -
ADN libre en medio de cultivo.....	- 16 -
DISCUSIÓN	- 25 -
CONCLUSIONES	- 28 -
BIBLIOGRAFÍA	- 29 -

RESUMEN

Resumen: Este trabajo es una revisión bibliográfica en la que se realiza un análisis DAFO (debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades) de las principales técnicas de obtención de ADN embrionario utilizadas en el presente y que podrían ser implementadas en un futuro. Las técnicas aplicadas hoy en día (biopsia de blastómeros y biopsia de trofoectodermo) para la obtención de ADN embrionario implican la biopsia de una o varias células del embrión con los riesgos que ello implica. Las nuevas aproximaciones mínimamente invasivas y no invasivas (blastocentesis y análisis de ADN libre en medio de cultivo respectivamente) presentan la ventaja de no retirar células del embrión, pero todavía necesitan ser mejoradas antes de ser aplicadas en la clínica. De las cuatro técnicas analizadas en este trabajo la biopsia de trofoectodermo es la mejor opción para ser aplicada en la actualidad pero la mejora del análisis de ADN libre en medio de cultivo podría implicar su sustitución en un futuro.

Palabras clave: PGT; niPGT; Blastocentesis; Biopsia de trofoectodermo; Biopsia de blastómeros; Análisis de ADN libre e medio de cultivo; diagnóstico genético preimplantacional; no invasivo ; análisis DAFO.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional (PGT) es una técnica aplicada en la reproducción asistida con el objetivo de minimizar las opciones de transferir embriones con anomalías genéticas formados mediante la fertilización *in vitro* (FIV) (1).

Antes de la aparición de esta técnica las pacientes embarazadas con riesgo de transmitir a su descendencia alguna anomalía genética solo tenían la opción de la terminación del embarazo después del diagnóstico prenatal o la posibilidad de tener un descendiente afectado. Otras alternativas previas al embarazo incluían la donación de gametos o la adopción. Con el primer PGT llevado a cabo, el panorama cambió y hoy en día las motivaciones principales de estos pacientes para someterse a un PGT son entre otras la posibilidad de tener un descendiente propio con un riesgo reducido de heredar la condición genética (con mayor impacto en aquellas parejas con un descendiente que padece la condición genética), el sentido de la responsabilidad y culpabilidad ante una condición que se podía haber evitado mediante PGT, o evitar la terminación del embarazo entre otros (2).

Para poder realizar un PGT en un embrión es necesario conseguir ADN genómico embrionario, lo que implica la obtención de una o varias células del embrión. Los primeros intentos de biopsia se realizaron en los años 60 y 70 en granjas para sexar embriones. En 1967 Richard Gardner biopsió por primera vez células del trofooctodermo (TE) de un embrión de ratón y consiguió mediante tinción y posterior análisis microscópico, diferenciar corpúsculos de Barr identificando así los embriones femeninos. Después de esto, Gardner y Robert Edwards propusieron que esta misma técnica podría ser aplicada en humanos con posibles enfermedades ligadas al cromosoma X. Sin embargo, no fue hasta el año 1985 que se hicieron los primeros intentos de biopsiar embriones humanos mediante la bisección por Verlinsky, Pergament y sus colegas. Así, después de las numerosas publicaciones demostrando el poder de la PCR en la amplificación de fragmentos cortos de DNA se comenzó a discutir la posibilidad de poder realizar PGT en embriones humanos siendo en 1989 cuando se realizó la primera biopsia de una sola célula de un embrión en estadio de división en pacientes con enfermedades hereditarias ligadas al X por Handyside et al. Inspirados por los experimentos de Edwards y Gardner con blastocistos de ratón, Dokras y sus colegas hicieron las primeras biopsias

de blastocistos humanos en 1990 y ese mismo año Handyside et al. reportaron los primeros embarazos después de PGT para enfermedades ligadas al X (3,4).

Los diferentes avances que se han ido dando poco a poco en el campo de la genética junto con la evolución de la reproducción asistida han provocado cambios drásticos en la práctica del PGT. Los mayores avances en los últimos 10 años han sido la introducción de la vitrificación como método seguro de criopreservación y los cambios en los métodos genéticos (técnicas dirigidas al análisis de genoma completo) y técnicas de biopsia (de biopsia en día 3 a biopsia en estadio de blastocisto o día5/6). Con esto, el enfoque clásico de transferencia en fresco en los ciclos de PGT ha sido sustituido por una estrategia de criopreservación de todos los embriones hasta la obtención de los resultados genéticos y posterior transferencia de embriones sanos en ciclo no estimulado. Además, con el descenso de los costes de la secuenciación, el análisis genético llevado a cabo durante el PGT cada vez se inclina más hacia la secuenciación y una diagnóstico tres en uno para PGT-M (enfermedades monogénicas), PGT-SR (reordenamientos estructurales) y PGT-A (aneuploidías) (5).

Pese a todos los avances que se han dado en el campo del PGT, hoy en día sigue implicando la biopsia de una o varias células de embriones en estadio de blastómero (día 3) o blastocisto (día 5 o 6) lo que es considerado una de las prácticas más invasivas en la reproducción asistida (6). Por este motivo entre otros, el descubrimiento de ADN embrionario en el medio de cultivo y fluido blastocélico han abierto las puertas a la posibilidad de poder generar aproximaciones no invasivas en el PGT (7).

El objetivo de este trabajo es comparar las debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades (análisis DAFO) que ofrecen las técnicas que se han utilizado recientemente y que se utilizan en la actualidad para la obtención de ADN embrionario para el PGT. Compararlo de igual manera con las técnicas no invasivas que están surgiendo y tienen potencial de ser aplicadas en un futuro.

PGT TIPOS E INDICACIONES PRINCIPALES

Las parejas que optan por aplicar el PGT son referidos a esta técnica por su médico (ginecólogo, genetista clínico o especialistas de la enfermedad que padecen o de la cual son portadores) o en algunas ocasiones son informados de esta técnica a través de internet o recomendaciones de personas cercanas. Previo a la aplicación del PGT, los pacientes son evaluados por un equipo multidisciplinar y en los casos necesarios se pide consejo de especialistas. Antes de comenzar el ciclo se requiere de asesoramiento genético y reproductivo extensivo. Además se debe ofrecer apoyo psicológico e informar a las parejas de todos los aspectos del PGT incluyendo las tasas de éxito y el riesgo de un diagnóstico incorrecto (5) .

A continuación, se describen los principales tipos de PGT y sus indicaciones:

PGT-A

EL PGT-A o diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías se recomienda a parejas con infertilidad sin ningún historial familiar de enfermedades genéticas que comienzan ciclos de fecundación in vitro, tienen cariotipo y test de trombofilia normales y han experimentado abortos de repetición, parejas con fallo de implantación recurrente, parejas con un descendiente afectado, mujeres de edad materna avanzada (>35 años), historial de radioterapia o quimioterapia, parejas con baja calidad embrionaria en ciclos de fecundación in vitro, hombres con infertilidad de factor masculina severa (azoospermia u oligospermia severa) (8).

PGT-M

El PGT-M o diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades monogénicas, se recomienda a parejas portadoras de enfermedades causadas por mutaciones en un solo gen que desean reducir al máximo el riesgo de tener descendencia afectada y evitar la toma de decisiones (interrumpir el embarazo) si hubiera un test prenatal con resultados anormales (8).

PGT-SR

En los casos de PGT-SR o diagnóstico genético preimplantacional para reordenamientos estructurales, a diferencia de en el PGT-A, las anomalías cromosómicas son heredadas de uno o ambos progenitores que son portadores del reordenamiento estructural. Estos portadores tienen riesgo de producir embriones anormales además de enfrentarse a infertilidad y problemas de subfertilidad. Generalmente se recomienda para detectar aquellos reordenamientos que han sido previamente identificados en los cariotipos de los progenitores (8).

ANÁLISIS DAFO

El análisis DAFO es una herramienta que permite analizar la realidad de una empresa, marca o producto para poder tomar decisiones de futuro. En el caso concreto de este trabajo se aplica esta herramienta para analizar la debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades que ofrecen las diferentes técnicas que se aplican y se podrían aplicar en un futuro para el PGT.

El análisis DAFO incluye un análisis interno y uno externo:

- **Análisis interno** → Fortalezas y debilidades.
 - Se evalúa la situación de la empresa o el proyecto considerando sus fortalezas y debilidades. En este trabajo se evaluarán las fortalezas y debilidades propias de cada una de las técnicas.
- **Análisis externo** → Amenazas y oportunidades.
 - No son características propias de la empresa o del proyecto, sino que pertenecen al exterior de la misma, sin embargo no deben ser ignoradas para poder superar las amenazas y aprovechar las oportunidades. En este trabajo se tendrán en consideración las amenazas y oportunidades que brindan cada una de las técnicas en comparación con el resto y con la situación actual del PGT (9)

TÉCNICAS INVASIVAS

Las técnicas invasivas para la obtención de ADN genómico de los embriones implican la biopsia de una o varias células del embrión (10). El procedimiento de la biopsia consiste en dos pasos principales, primero se crea una apertura en la zona pelúcida (ZP) y

posteriormente se retiran células del embrión. La biopsia puede ser llevada a cabo en el estadio de división embrionaria retirando uno o dos blastómeros o se pueden biopsiar entre 5 y 10 células del trofoectodermo en el estadio de blastocisto. La biopsia de blastómeros ha sido el método más utilizado durante la última década pero hoy en día la técnica más utilizada es la biopsia de células del trofoectodermo del embrión en estadio de blastocisto (11).

Biopsia en día 3 o biopsia de blastómeros

La biopsia de blastómeros se realiza el día 3 post-inseminación entre el estadio de 6 células y la pre-compactación. Los tiempos exactos varían en cada laboratorio. Los embriones criopreservados y se biopsian de manera similar a los embriones frescos. Se deben biopsiar los embriones en estadio de seis o más células con una calidad aceptable (un 25% o menos de fragmentación, pero también se pueden biopsiar con fragmentación de 25%-50%).

La biopsia se realiza en medio de biopsia o en un medio con HEPES después de haberse incubado en medio de biopsia. La apertura de la zona pelúcida se puede realizar mediante láser o mecánicamente. El orificio debe tener aproximadamente el diámetro de la pipeta de biopsia. Se recomienda visualizar los núcleos de los blastómeros para poder seleccionar aquellas células que no sean binucleadas para el posterior análisis mediante FISH. La ESHRE recomienda la biopsia de una única célula aunque en algunas ocasiones sea necesaria la biopsia de dos células para que el análisis genético tenga mayor precisión o por si la célula se lisara o no tuviera núcleo (11).

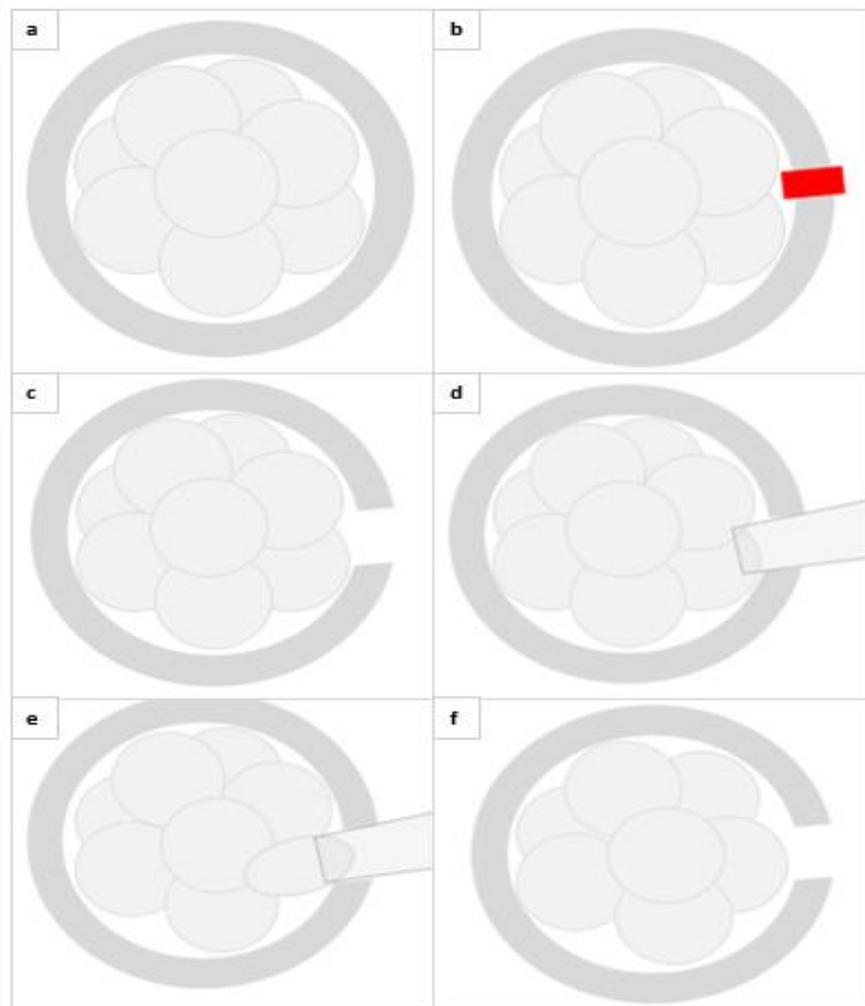


Figura 1. Biopsia de blastómeros: **a.** Embrión en día 3 con 8 blastómeros. **b.** Apertura de la zona pelúcida mediante láser. **c.** Embrión con zona pelúcida perforada. **d.** Introducción de la pipeta de biopsia. **e.** Aspiración de blastómero con pipeta de biopsia. **f.** Embrión post-biopsia con 7 blastómeros y zona pelúcida perforada.

- **Debilidades**

- La biopsia en día 3 proporciona una única célula (retirar 2 está desaconsejado) por lo que:

- La cantidad de ADN para el análisis es limitado ya que solo se puede analizar el ADN de una sola célula (11).
- Permite la detección de errores meióticos, pero no mitóticos que dan lugar a mosaicismo, ya que el análisis de un único blastómero no permite la detección de este fenómeno (11).
- Los blastómeros en ese estadio de desarrollo tiene el potencial de contribuir tanto a la MCI como al TE por lo que se podría estar retirando una célula que daría lugar al embrión (feto) (11).
- Solo se puede realizar en día 3, lo que implica una gran carga de trabajo teniendo en cuenta que la mayoría de los cigotos no quedan bloqueados antes del día 3. Esto implica biopsiar embriones que podrían no seguir desarrollándose y no se puede predecir en este estadio (11).
- En un estudio que compara los resultados obtenidos con biopsia de blastómeros con la biopsia de trofoectodermo se ha visto que (12):
 - Se biopsiaron más embriones en estadio de división por paciente que blastocistos.
 - El porcentaje de embriones biopsiados con diagnóstico concluyente fue menor en el grupo de embriones en estadio de división.
 - La tasa de embriones euploides fue menor y la tasa de embriones con aneuploidías complejas mayor en el grupo de embriones en estadio de división en comparación con los blastocistos.
 - Menos ciclos terminaron en transferencia en el grupo de embriones biopsiados en estadio de división.
 - Después de la transferencia de blastocistos euploides, la tasa de embarazo clínico por ciclo fue significativamente menor en el grupo de embriones biopsiados en estadio de división.
 - Teniendo en cuenta transferencias sucesivas la tasa acumulada de partos por ciclo iniciado con al menos un recién nacido vivo (RNV) fue mayor en el grupo de biopsia de blastocisto.
- **Amenazas**
 - El coste eficiencia de la biopsia de TE es mejor que la de la biopsia de blastómeros (12).

- Aunque ambas (biopsia de blastómero y biopsia de TE) estrategias de biopsia pueden ofrecer buenos resultados, la biopsia de TE ofrece un diagnóstico más robusto y su intervención parece dañar menos los embriones (12).
- **Fortalezas**
 - Después de ser biopsiados, los embriones pueden seguir incubándose hasta que se reciba el resultado del análisis genético y ser transferidos en fresco o después de haber sido criopreservados (11).
 - Permite hacer una rebiopsia si fuera necesario en estadio de blastocisto y seguir teniendo la oportunidad de hacer la transferencia en fresco evitando la criopreservación (11).
 - En un estudio que compara los resultados obtenidos con biopsia de blastómeros con la biopsia de trofoectodermo se ha visto que (12):
 - No hubo diferencias en la tasa de embarazo clínico por embrión biopsiado ni en la tasa de implantación.
 - No hubo diferencias significativas en abortos ni en la tasa de embarazo ectópico.
 - La tasa de recién nacido vivo por ciclo y por transferencia también fueron similares en ambos grupos.
- **Oportunidades**
 - Para los laboratorios con un protocolo bien establecido de biopsia de blastómero en estadio de división embrionaria y buenos resultados, abandonar esta estrategia de biopsia puede resultar difícil (12).
 - Es la aproximación con mayor experiencia a nivel mundial hasta ahora y su complejidad se considera moderada-baja (11).

Biopsia de trofoectodermo

La biopsia de trofoectodermo (TE) permite la escisión de varias células para el análisis genético, además de ser una técnica no invasiva para las células de la masa celular interna (MCI), que son aquellas destinadas al desarrollo fetal. El flujo de trabajo ideal debe incluir un protocolo seguro y eficiente de vitrificación post-biopsia debido al tiempo de espera que suponen las técnicas de diagnóstico genético y para poder transferir los

embriones seleccionados en un ciclo natural o sustituido con el endometrio en un estado fisiológico o más similar al fisiológico.

La biopsia debe realizarse en embriones frescos o criopreservados que hayan sido evaluados para la formación de blastocisto. Se realiza el entre el día 5-7 post-inseminación una vez que la masa celular interna es claramente visible. El procedimiento de biopsia depende de la morfología y la calidad del blastocisto, su grado de expansión y la posición de la MCI. En la biopsia de blastocisto está altamente recomendado el uso del láser para realizar la apertura de la zona pelúcida y separar las células del trofoectodermo. Hay varios métodos descritos de apertura de la zona pelúcida (ZP):

- Apertura de la ZP en día 3-4 post inseminación y escisión de células del TE en día 5-7 post inseminación.
- Apertura de la ZP el día de la formación de blastocisto para después incubar el embrión y que las células puedan salir a través de la apertura realizada posibilitando la retirada de las células del TE.
- Apertura de la ZP y biopsia de células del TE simultánea en el día de expansión completa del blastocisto.

El estudio realizado por Zhao et al. (13) sostiene que se debería realizar la apertura de la ZP inmediatamente antes de la biopsia de TE en el día 5-6 en lugar de hacerlo en día 3. Aun así, las tasas de embarazo clínico, nacido vivo y aborto son similares en ambos casos. La única diferencia reside en la tasa de blastocistos que se congelan, ya que la apertura de ZP en día 3 hace que haya menos blastocistos. Esto podría deberse a que la apertura de la ZP en día 3 tuviera efectos negativos en el desarrollo del embrión desde el estadio de blastómeros a estadio de blastocisto por el mayor tiempo de manipulación in vitro en comparación con la apertura de ZP inmediatamente antes de la biopsia en día 5-6.

Para la biopsia la MCI debe posicionarse entre las 7h y las 11h para que esté visible y lejos de la apertura de la ZP. Después las células del TE se aspiran con la pipeta de biopsia. Se utilizan pulsos de láser para romper las uniones célula-célula y escindir las células aspiradas del blastocisto y así evitar el daño que se genera mediante la escisión por deslizamiento de la pipeta de biopsia contra la pipeta de sujeción

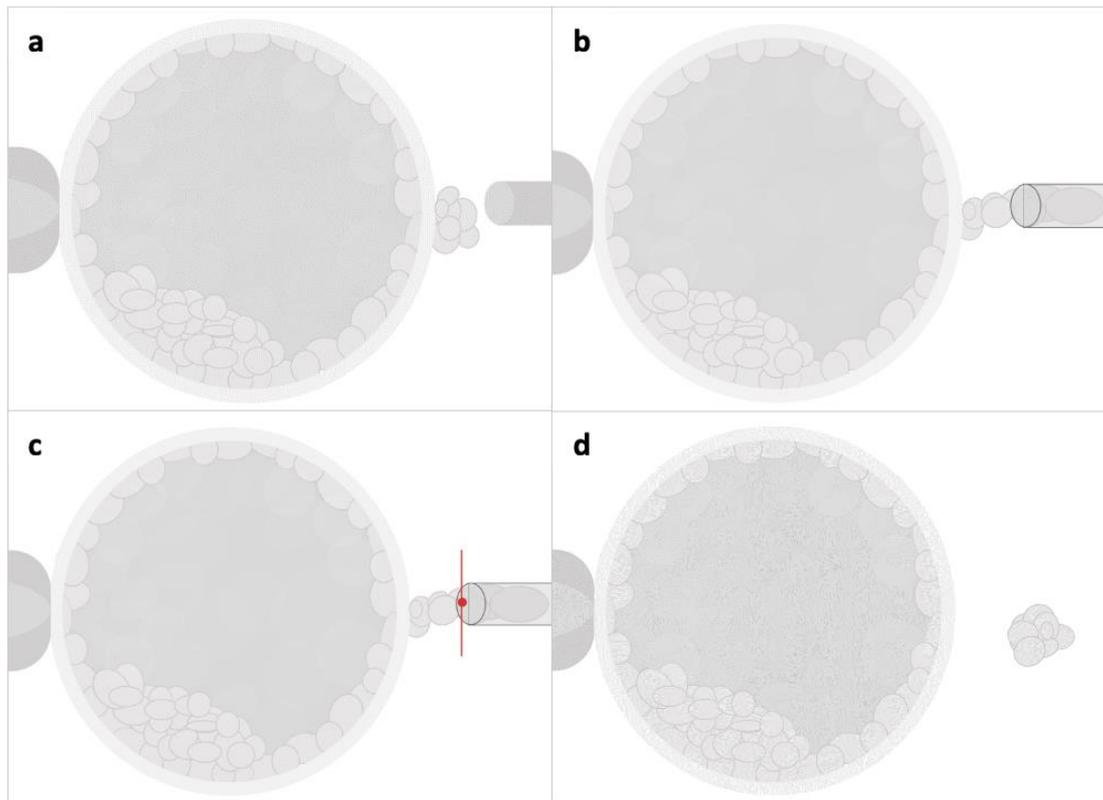


Figura 2. Biopsia de TE: **a.** Blastocisto con hatching iniciado y células del TE en el exterior. **b.** Aspiración de células del TE con la pipeta de biopsia. **c.** Pulso de láser para la separación de las células a biopsiar del resto del blastocisto. **d.** Blastocisto y fragmento de células del TE biopsiado.

Dentro de las recomendaciones para llevar a cabo esta técnica está la de realizar una biopsia de 5-10 células, es importante no utilizar medios libres en calcio y magnesio, cambiar la pipeta de biopsia para cada embrión para evitar la contaminación y tras la biopsia, transferir inmediatamente el embrión a medio de cultivo y posterior vitrificación (11)(14)

- **Debilidades**

- Después de la biopsia, la criopreservación es casi obligada debido al tiempo que conllevan las técnicas de análisis genético posteriores, por lo que el laboratorio debe tener implantado un programa de criopreservación eficiente (11).

- Se necesita equipamiento especializado y un operador experto para mantener los protocolos estandarizados y proteger la viabilidad embrionaria (15).
- El posible daño causado durante la manipulación embrionaria es una preocupación para los pacientes y doctores (15).
- El mosaicismo puede presentarse en cualquiera de los estadios del desarrollo embrionario. La biopsia de TE basa su diagnóstico en el ADN embrionario de 5-10 células retiradas de un blastocisto de >100 células lo que pone en duda su precisión a la hora de diagnosticar mosaicismos (15).
- El mosaicismo embrionario da lugar a falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) en PGT-A debido a que la MCI que dará lugar al feto no se analiza y podría no tener el mismo componente genético que el trofoectodermo (16).
- **Amenazas**
 - Aunque los estudios de seguridad de la biopsia embrionaria indican que la biopsia de blastocisto puede tener un bajo impacto en el potencial de implantación de los embriones humanos, su influencia en el desarrollo posterior más allá del potencial de implantación debería ser investigado (6).
 - El PGT-A con biopsia de TE y transferencia en diferido no se debería implementar sin tener en cuenta que su éxito depende de tener un programa adecuado de cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto, embriólogos bien entrenados para la biopsia de TE, un programa de criopreservación óptimo y un grupo bien organizado. Aun teniendo todos estos aspectos en cuenta el efecto de la curva de aprendizaje no permitiría conseguir los mejores resultados de forma inmediata (12).
 - Los falsos positivos en PGT-A debido a mosaicismo pueden provocar el descarte de embriones sanos que podrían dar lugar a nacidos vivos euploides (16).
 - Los falsos negativos en PGT-A debidos al mosaicismo también suponen un problema debido a que su transferencia puede dar lugar a abortos o incluso a fetos aneuploides (16).

- Puede que la rápida transición de biopsia de blastómeros a biopsia de trofoectodermo haya generado que algunos de los potenciales riesgos asociados a esta técnica hayan sido pasados por alto (7).
- **Fortalezas**
 - La biopsia de TE implica la retirada de varias células (5-10) en día 5-7 de la parte del blastocisto que dará lugar a la placenta y las membranas extraembrionarias, manteniendo intacta la MCI desde donde se origina el feto (11).
 - Es una técnica más fiable de biopsia teniendo en cuenta que el análisis se realiza con un número mayor de células. La cantidad de ADN analizado es mayor con una tasa de diagnóstico no concluyente menor al 5% (11).
 - Se ha demostrado que sucede un proceso de selección embrionaria durante el desarrollo al estadio de blastocisto siendo el porcentaje de formación de blastocisto de alrededor de 50% , por lo que el número esperado de blastocistos biopsiados podría ser la mitad de los embriones biopsiados en estadio de división (día 3) (12).
 - Se pueden detectar errores mitóticos que dan lugar a mosaicismo con algunas limitaciones técnicas, metodológicas y biológicas (11).
 - En un estudio que compara los resultados obstétricos y neonatales entre un grupo de PGT con biopsia de TE y un grupo de FIV/ICSI se ha visto que (6):
 - El grupo de PGT tiene una tasa menor de peso muy bajo al nacer (PMBN) en comparación con el grupo de FIV/ICSI.
 - No se reportaron diferencias significativas en el peso medio al nacer, la tasa de peso bajo al nacer, la media de edad gestacional al nacer, la tasa de partos prematuros y muy prematuros, la tasa de defectos congénitos, la ratio de sexos, la tasa de partos por cesárea, la tasa de trastornos hipertensivos del embarazo, la tasa de diabetes gestacional, la tasa de placenta previa , la tasa de rotura prematura de membranas, la tasa de placenta abrupta, la tasa de placenta accreta y la tasa de retardo del crecimiento intrauterino.

- **Oportunidades**
 - En cuanto al coste eficiencia, la biopsia de TE es preferible ya que los embriones en D3 sin potencial de desarrollo hasta el estadio de blastocisto no serán biopsiados y analizados innecesariamente (12).
 - Permite llevar a cabo múltiples análisis para diferentes indicaciones con el mismo fragmento biopsiado después de someter la muestra a WGA (amplificación de genoma completo) (11).

TÉCNICAS NO INVASIVAS

Teniendo en cuenta los retos asociados a la biopsia embrionaria no es sorprendente que el hallazgo de ADN embrionario en el medio de cultivo y el fluido del blastocele hayan suscitado nuevas ideas sobre la posibilidad de generar aproximaciones no invasivas del PGT (niPGT). Los estudios actuales pretenden verificar si este ADN representa una fuente fiable de información sobre el estatus genético del embrión. Si se demostrase que es posible un PGT preciso a través de aproximaciones menos invasivas basadas en el ADN embrionario libre estas podrían aportar maneras más simples, seguras y consistentes de llevar a cabo el PGT. Además, los costes y las limitaciones logísticas se reducirían, el entrenamiento y el equipamiento asociado al PGT invasivo se eliminarían mejorando así la accesibilidad de los pacientes a esta técnica (7).

Blastocentesis

Para poder aplicar a la clínica un PGT basado en fuentes de ADN mínimamente invasivas existen dos requerimientos principales: el primero, que sea posible aislar y analizar el ADN de manera consistente para evitar la posibilidad de que no se pueda dar un diagnóstico clínico, y la segunda que el ADN analizado sea representativo del embrión en desarrollo para que el diagnóstico sea preciso (7).

La blastocentesis se ha propuesto como estrategia menos invasiva para la selección embrionaria. Implica la aspiración con una pipeta de inyección del líquido del blastocele del blastocisto expandido sin retirar células embrionarias (10)(17). Existen diferentes técnicas para la blastocentesis y esta es la descrita por Capalbo et. al (17) en su estudio:

- Se necesitan embriones totalmente expandidos.

- Con una pipeta de inyección se introduce suavemente en la zona pelúcida para después atravesar el trofooctodermo y llegar al centro de la cavidad blastocélica.
- Se aspira ligeramente el fluido hasta que la cavidad alcanza un 10% de su volumen inicial y se saca la pipeta de inyección del embrión.
- El fluido recogido se deposita en una microgota con el mismo tipo de medio que tenía el embrión.
- La microgota con el fluido se retira y se almacena a -80°C hasta que se vaya a hacer el análisis genético.

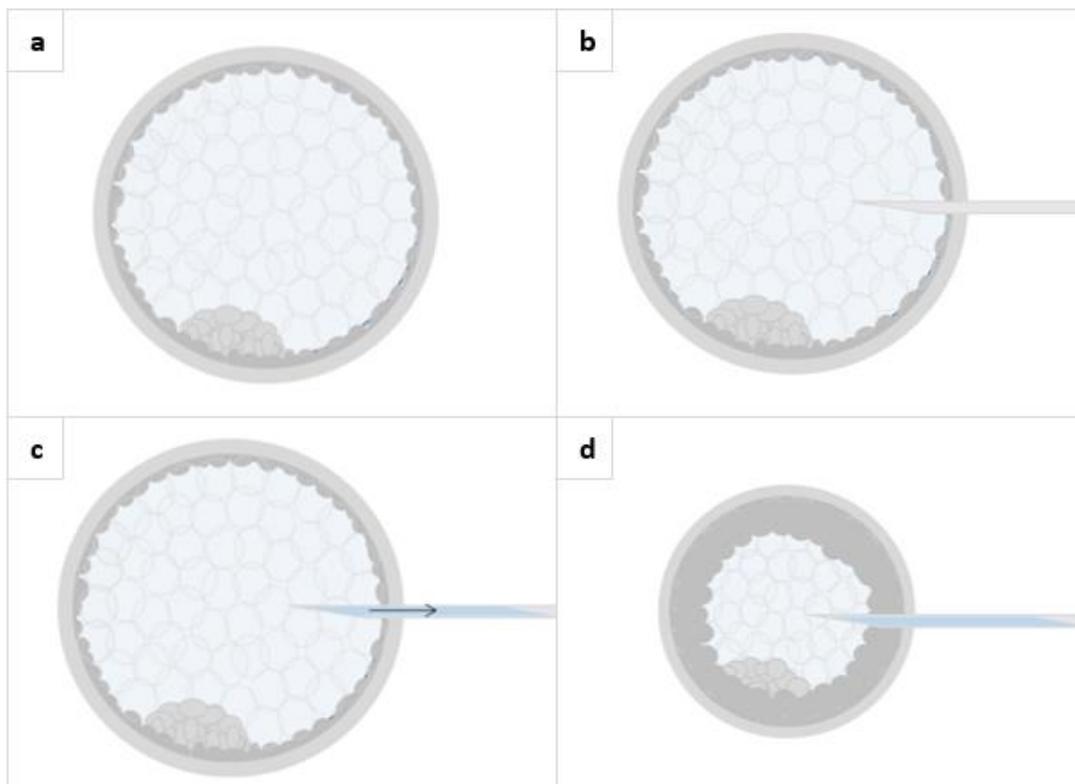


Figura 3. Blastocentesis: **a.** Blastocisto expandido. **b.** introducción de pipeta de inyección en el interior de la cavidad blastocélica. **c.** Aspiración del fluido blastocélico. **d.** Embrión post-aspiración del fluido blastocélico.

- **Debilidades**

- Se necesita un blastocisto expandido, por lo que no siempre se podrá realizar la blastocentesis (17).

- El ADN de las células presente en el fluido del blastocele podría proceder, al menos en parte, de células apoptóticas o necróticas lo que podría comprometer la integridad y la cantidad de ADN (10).
- Hay variación significativa en las tasas de amplificación y concordancia de fluido del blastocele con su respectiva biopsia de trofoectodermo (10).
- Requiere manipulación del embrión, ya que la zona pelúcida debe ser perforada para poder retirar el fluido del blastocele (10).
- Las cualidades técnicas requeridas para la retirada de fluido del blastocele son muy exigentes y un procedimiento subóptimo podría afectar al potencial reproductivo del blastocisto (18)
- Se induce el colapso del blastocisto a través de diferentes medios como el láser antes de la criopreservación con el objetivo del aumento de supervivencia post- desvitrificación, lo que hace que la técnica sea más invasiva (17).
- La cantidad de ADN presente en el fluido del blastocele varía considerablemente y es indetectable en algunos embriones (o en un estado que no permite su amplificación) (7).
- **Amenazas**
 - Los estudios realizados para evaluar la idoneidad del ADN presente en el fluido del blastocele para el PGT-M no han sido capaces de demostrar tasas de amplificación suficientemente altas en un número de muestras adecuado para que esta técnica pueda ser aplicada en la clínica (7).
 - Se debería cuantificar la incidencia de la contaminación de las muestras de fluido del blastocele con ADN no-embriionario, ya que falta información referente a este posible problema (7).
 - El proceso de blastocentesis podría estar asociado a una curva de aprendizaje considerable (7).
- **Fortalezas**
 - Es menos invasivo que una biopsia ya que evita la escisión de células del trofoectodermo del blastocisto en desarrollo (17).
 - Se ha visto que la aspiración activa del fluido del blastocele no afecta a la arquitectura embrionaria permitiendo tasas altas de supervivencia en embriones con mejor y peor morfología (17).

- **Oportunidades**

- Si se consiguiera una precisión y reproducibilidad suficientes podría abrir las puertas a una aproximación mínimamente invasiva para el PGT en embriones de FIV (17).
- Aproximaciones futuras de la blastocentesis podrían evitar algunas de sus limitaciones empleando nuevas tecnologías de amplificación de ADN adaptadas ADN degradado o utilizando tecnologías con una mayor sensibilidad de detección como la NGS (secuenciación de próxima generación), PCR digital y pirosecuenciación (7).

ADN libre en medio de cultivo

La detección de AND libre en el medio cultivo de embriones en desarrollo ha permitido la generación una nueva aproximación para el PGT no invasivo. Esta aproximación se basa en la recogida del medio de cultivo donde se ha desarrollado el embrión y su posterior análisis para la determinación del estatus genético del mismo.

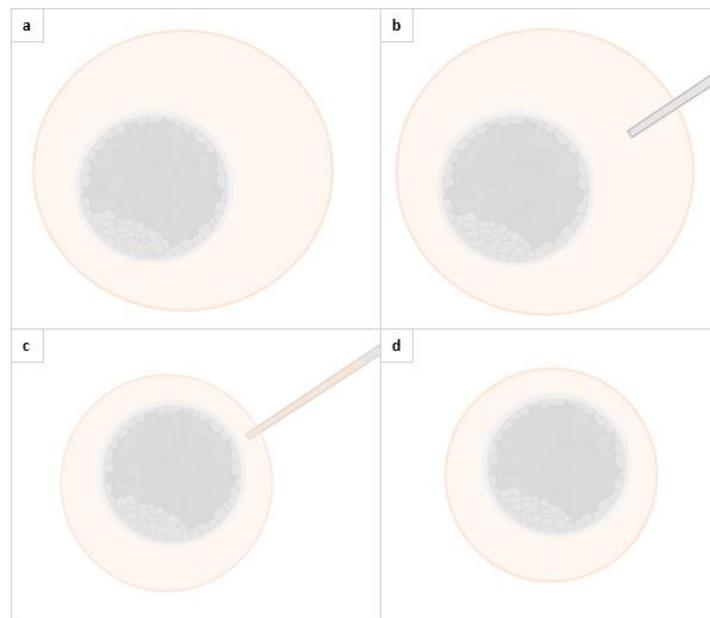


Figura 4. Recogida de medio de cultivo: **a.** Blastocisto en medio de cultivo. **b.** Pipeta introducida en el medio de cultivo preparada para aspirar el medio. **c.** Pipeta aspirando el medio de cultivo. **d.** Blastocisto post -retirada de medio de cultivo.

- **Debilidades**

- El ADN libre en el medio de cultivo tiene una procedencia todavía desconocida. Se ha propuesto que el origen de este ADN podría ser de las células de la masa celular interna (MCI) o del trofoectodermo (TE) pero aún se desconoce los mecanismos por los cuales ese ADN sería secretado al medio (10).
- La heterogeneidad entre las diferentes aproximaciones estudiadas para el análisis de ADN libre en el medio de cultivo hace que su aplicación clínica sea limitada (1).
- Todavía es necesaria la adaptación de protocolos de FIV y realizar validaciones previas antes de llevar a cabo PGT-A no invasivo (niPGT-A)(10).
- Los embriones cultivados hasta día 5 tienen una mayor tasa de no informatividad y mayor presencia de ADN degradado que puede interferir en los resultados. El medio de cultivo procedente de embriones cultivados hasta el día 6 muestran mayor tasa de informatividad y concordancia(10).
- Las tasas de detección, amplificación y concordancia deben mejorar antes de la implementación del ni-PGT en la rutina de la práctica clínica (18)

- **Amenazas**

- El cultivo prolongado hasta día 6 de embriones con el objetivo de conseguir mayor informatividad y concordancia podría afectar la viabilidad y el potencial de implantación de los embriones en cultivo hasta día 6 (10).
- La manipulación de los medios de cultivo debe ser muy cuidadosa debido a que la contaminación del medio es una gran amenaza en esta aproximación no invasiva. La contaminación proviene principalmente de células del cúmulus o fuentes externas como los técnicos, un medio contaminado o superficies y materiales de trabajo (10). La contaminación puede darse antes, durante y después del cultivo embrionario (18)
- Hasta que se dilucide el mecanismo concreto por el cual los embriones liberan ADN al medio de cultivo el ni-PGT-A se seguirá cuestionando como fuente fiable del estatus cromosómico embrionario (10).

- Debido al gran riesgo de contaminación materna y su consecuente diagnóstico erróneo, el análisis de ADN libre en medio de cultivo no debería utilizarse en el diagnóstico de mutaciones de un único gen hasta que los factores de riesgo sean detectados y prevenidos con precisión (17).
- **Fortalezas**
 - Se han realizado diferentes aproximaciones con diferentes metodologías y protocolos en el desarrollo del niPGT-A y se ha visto que ni el equipamiento ni los materiales ni medios utilizados influyen a los resultados obtenidos con los diferentes métodos (10).
 - Tanto la FIV como el ICSI proporcionan una sensibilidad y especificidad similar por lo que ambas técnicas podrían ser aplicadas siempre y cuando los ovocitos o cigotos se decumulen con cuidado en ambas técnicas(10).
 - Diferentes publicaciones han mostrado aproximaciones completamente no invasivas (sin hatching asistido, ni colapso del embrión o vitrificación) con concordancia de ploidia de hasta un 84% con la biopsia de TE (10).
 - El niPGT-A permite un acceso más amplio al análisis genético y evita varias consideraciones legales y éticas(10).
 - Se puede realizar en cualquier laboratorio sin necesidad de equipamiento extra (10).
 - La recogida del medio de cultivo es un procedimiento fácil y seguro que puede realizarse en todos los embriones sin necesidad de preparación especial en manipulación embrionaria como la biopsia o la blastocentesis (18).
 - El medio de cultivo puede ser recogido en cualquiera de los estadios de desarrollo embrionario (18).
 - El ni-PGT es un procedimiento rápido (menos de 12h desde la recogida de medio hasta el análisis genético) lo que permite que los resultados estén disponibles antes de la transferencia embrionaria o la criopreservación. Además, en el caso de tener un diagnóstico positivo se podría recoger otra vez el medio de cultivo para la confirmación del diagnóstico (18).
 - La biopsia de TE representa la composición genética de las células biopsiadas, en cambio, el análisis de ADN libre en medio de cultivo podría ser más representativo de la ploidía completa del embrión en el momento de la recogida (19).

- **Oportunidades**

- Ofrecer los mismos beneficios que un PGT-A invasivo evitando las desventajas de la manipulación embrionaria y la biopsia (10)
- Varios estudios han demostrado que el origen del ADN libre en el medio de cultivo no es derivado únicamente de células necróticas y apoptóticas sino que podrían proceder de células embrionarias (MCI y TE) por lo que esto aportaría información genética tanto de las células del TE como de las de la MCI (10).
- El niPGT-A utilizando medio de cultivo con ADN libre combinado con la evaluación morfológica podría mejorar los resultados clínicos en ciclos de FIV (10).
- La incorporación del niPGT-A en programas clínicos puede hacerse tomando el análisis de ADN libre en el medio de cultivo como un biomarcador para priorizar embriones a transferir hasta que se valide su uso como prueba de diagnóstico (10).
- El ni-PGT basado en el ADN libre en el medio de cultivo se podría utilizar para el estudio de embriones cultivados con bajo potencial de implantación que no pueden ser biopsiados (18).
- Si se consigue enriquecer el medio de cultivo de ADN embrionario se harán grandes logros en el campo del PGT (17).
- Si se consiguiera determinar los protocolos y algoritmos para el ni PGT-A , este se convertiría en una herramienta válida para el PGT-A (20).
- El niPGT-A puede aportar información adicional valiosa para la detección de errores mitóticos y ayudar en la comprensión del mosaicismo permitiendo elucidar el impacto real del mosaicismo en los resultados clínicos ya que podrían aportar nuevas fuentes de ADN embrionario que es potencialmente liberado de células de todo el embrión (15).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las limitaciones expuestas en estudios previos Brouillet et. al (18) proponen las siguientes medidas para el aumento de la detección del ADN embrionario y la reducción del riesgo de contaminación exógena y materna los próximos estudios:

Para reducir la contaminación exógena se recomienda:

- Utilizar guantes, mascarilla, gorro y bata durante el procedimiento.

- Trabajar en cabinas con flujo de aire laminado.
- Utilizar pipetas, tubos y puntas estériles desechables para cada embrión o muestra de medio de cultivo.
- Fecundación mediante ICSI para minimizar la contaminación del medio con ADN paterno.
- Cultivo embrionario individual en gotas separadas.
- Hacer controles negativos (ej. Medios de FIV no utilizados) para analizar la contaminación.
- Recoger todo el volumen del medio de cultivo para maximizar la cantidad de ADN obtenido de una muestra y así aumentar las tasas de detección y amplificación.
- Después de la recogida del medio este debe ser inmediatamente congelado y mantenido a -20°C (pocos días) o a -80°C (meses o años).
- Análisis directo del medio de cultivo mediante secuenciación de genoma completo con amplificación previa.

	Técnicas Invasivas		Técnicas no invasivas	
	Biopsia de blastómeros	Biopsia de trofoectodermo	Blastocentesis	ADN libre en medio de cultivo
Debilidades	<ul style="list-style-type: none"> -ADN de una sola célula: análisis limitado y no detección de mosaicismos. -Retirada de posibles células de la MCI. -Mayor carga de trabajo. -Comparación con biopsia de TE: más embriones biopsiados por paciente, menor porcentaje de diagnóstico concluyente, menos embriones euploides y más con aneuploidías complejas, menos ciclos que acaban en transferencia, menor tasa de embarazo clínico por ciclo, menor tasa acumulativa de partos por ciclo iniciado con al menos 1 RNV. 	<ul style="list-style-type: none"> -Criopreservación obligada. -Necesidad de equipamiento especializado y operador experto. -Posible daño durante la biopsia. -Mosaicismo no siempre se detecta porque se biopsian solo algunas células de todo un embrión. -Solo se analiza el TE y no la MCI, por lo que FP y FN debidos a mosaicismo. 	<ul style="list-style-type: none"> -Se necesita un blastocisto expandido. -El origen del ADN del fluido blastocélico podría ser las células apoptóticas o necróticas. -Variación en las tasas de amplificación y concordancia. -Requiere manipulación embrionaria. -Precisa de cualidades técnicas muy exigentes. -Se emplea el colapso del blastocisto por lo que es más invasivo. -La cantidad de ADN presente en el fluido blastocélico es muy variable. 	<ul style="list-style-type: none"> -Origen del ADN todavía desconocido. -Protocolos muy heterogéneos por lo que aplicación clínica limitada. -Se necesita adaptar los protocolos de FIV y realizar validaciones. -Los embriones cultivados hasta día 6 tienen mayor tasa de informatividad y concordancia. -Tasas de detección, amplificación y concordancia deben mejorar antes de la aplicación clínica.

Amenazas		<p>-Faltan estudios de la influencia de la biopsia más allá del potencial de implantación.</p> <p>-Se necesita un buen programa de cultivo hasta blastocisto, embriólogos bien entrenados, programa de criopreservación óptimo y grupo bien organizado.</p> <p>-La curva de aprendizaje no permite buenos resultados desde el inicio de la implementación.</p> <p>-FP en PGT-A por mosaicismo riesgo de descartar de embriones sanos.</p> <p>-FN en PGT-A por mosaicismo transferencia de embriones aneuploides y aborto y fetos aneuploides.</p>	<p>-No se ha demostrado amplificación suficiente en un número de muestras adecuado.</p> <p>-Debería cuantificarse la incidencia de la contaminación con ADN no embrionario.</p> <p>-Podría estar asociado a una curva de aprendizaje considerable.</p>	<p>-El cultivo hasta el día 6 podría afectar la vitalidad y el potencial de implantación.</p> <p>-La manipulación de los medios debe ser muy cuidadosa por el riesgo de contaminación con ADN no embrionario.</p> <p>-Se cuestiona la fiabilidad de la prueba por el desconocimiento del origen del ADN libre.</p> <p>-No debería utilizarse para el PGT-M debido al alto riesgo de contaminación con ADN materno.</p>
Fortalezas	<p>-Permite biopsiar y rebiopsiar sin necesidad de criopreservación (transferencia en fresco).</p> <p>-Comparación con biopsia de TE: tasas similares de embarazo clínico e implantación por embrión biopsiado, no diferencias significativas de abortos y embarazos ectópicos, tasa de RNV por ciclo y transferencia similares.</p>	<p>-Se mantiene intacta la MCI.</p> <p>-Mayor número de células y más ADN, por lo que análisis más fiable.</p> <p>-Proceso de selección hasta estadio de blastocisto, por lo que menor número de embriones a biopsiar.</p> <p>-Detección de errores mitóticos (mosaicismo).</p> <p>-Comparación con embriones no biopsiados: biopsiados menor tasa de PMBN, no diferencias en el PMN, PBN,MEGN, PP, PMP, DC, RS, PC, THE, DG, PLP, RPM, PLA, PLAC y RCIU.</p>	<p>-Menos invasivo que una biopsia.</p> <p>-La aspiración del fluido blastocélico no parece afectar a la arquitectura embrionaria.</p>	<p>-Diferentes metodologías y protocolos han demostrado que los diferentes medios y materiales utilizados no influyen los resultados obtenidos.</p> <p>-Tanto la FIV como el ICSI proporcionan una sensibilidad y especificidad similar, ambas técnicas se pueden aplicar.</p> <p>-Alta concordancia en la ploidía con la biopsia de TE.</p> <p>-Acceso más amplio al análisis genético y evita consideraciones legales y éticas.</p>

				<p>-Sin necesidad de equipamiento extra.</p> <p>-Procedimiento fácil y seguro, no necesita preparación especial.</p> <p>-El medio puede recogerse en cualquier estadio del desarrollo embrionario.</p> <p>-Procedimiento rápido. Permite volver a recoger medio y analizarlo y hacer la transferencia en fresco.</p> <p>-El ADN podría ser representativo de la ploidía completa del embrión.</p>
Oportunidades	<p>-Laboratorios con protocolos bien establecidos obtienen buenos resultados.</p> <p>-Aproximación con mayor experiencia a nivel mundial.</p> <p>-Complejidad moderada-baja.</p>	<p>-Mejor balance coste / eficiencia.</p> <p>-Permite realizar múltiples análisis con un mismo fragmento biopsiado.</p>	<p>-Con la precisión y reproducibilidad suficientes podría abrir las puertas a una aproximación mínimamente invasiva.</p> <p>-Aproximaciones futuras empleando nuevas tecnologías de amplificación de ADN se podrían evitar algunas de las limitaciones que presenta actualmente.</p>	<p>-Ofrecer los beneficios de un PGT invasivo evitando las desventajas de la manipulación.</p> <p>-El ADN podría proceder de la MCI y el TE aportando información más completa.</p> <p>-Combinado con la evaluación morfológica podría mejorar los resultados clínicos en ciclos de FIV.</p> <p>-El niPGT-A puede incorporarse a programas clínicos como biomarcador para priorizar embriones a transferir hasta su validación como método diagnóstico.</p>

				<p>-Se podría utilizar para el estudio de embriones cultivados con bajo potencial de implantación y no pueden ser biopsiados.</p> <p>-Si se consigue enriquecer el medio en ADN embrionario se harían grandes logros en el campo del PGT.</p> <p>- Con protocolos y algoritmos establecidos, buena herramienta para el PGT-A.</p> <p>-Podría ayudar en la comprensión des mosaicismo y su impacto en los resultados.</p>
--	--	--	--	--

Tabla 1. Resumen del análisis DAFO.

DISCUSIÓN

Las cuatro técnicas de obtención de ADN embrionario expuestas presentan ventajas y limitaciones que deben ser estudiadas para poder hacer un balance y seleccionar aquella que ofrezca mayores beneficios y seguridad con el menor riesgo.

Con relación a las técnicas invasivas, la biopsia de TE presenta claras ventajas respecto a la biopsia de blastómeros. Primeramente, permite el análisis de varias células que además no pertenecen a la MCI que dará lugar al feto por lo que se consigue más ADN de una forma menos invasiva. Por otro lado, la escisión de varias células (biopsia de TE) también permite la detección de mosaicismos, sin embargo, la biopsia de un único blastómero no permite esta detección. Además, teniendo en cuenta que el cultivo hasta estadio de blastocisto se podría considerar un proceso de selección, menos embriones con anomalías cromosómicas llegan hasta este estadio, se biopsian menos embriones por lo que la carga de trabajo es menor y el balance coste/eficiencia de la biopsia de TE es mejor.

La biopsia de blastómeros por su parte presenta la ventaja de poder biopsiar y rebiopsiar y hacer la transferencia en fresco en ese mismo ciclo sin necesidad de criopreservar los embriones lo que conlleva la implementación de un buen programa de criopreservación en el caso de la biopsia de TE. Además, la transición de la biopsia de blastómeros a biopsia de TE implica una curva de aprendizaje que no permite obtener los mejores resultados desde el inicio, por lo que en laboratorios con protocolos bien establecidos de biopsia de blastómeros con buenos resultados resulta difícil realizar el cambio. Con relación a los resultados de los ciclos de biopsia de TE y blastómeros ambos obtienen tasas similares de embarazo clínico e implantación por embrión biopsiado, tasas de aborto y embarazos ectópicos y tasa de RNV por ciclo y transferencia.

Teniendo estos aspectos en cuenta no es sorprendente que hoy en día la balanza se esté inclinando hacia la biopsia de TE, en cuanto a las técnicas no invasivas, entre la blastocentesis y el análisis de ADN libre en el medio de cultivo, esta segunda técnica presenta algunas ventajas respecto a la blastocentesis. La primera ventaja es que la blastocentesis implica manipulación mínima y en el análisis de ADN libre en medio de cultivo el embrión no sufre ningún tipo de manipulación. Además, el análisis del ADN en medio de cultivo presenta mejores tasas de amplificación y concordancia con los resultados de la biopsia de TE. Por otra parte, el análisis del medio de cultivo es una técnica fácil, rápida y segura en la que el medio puede recogerse en cualquiera de los

estadios de desarrollo embrionario mientras que la blastocentesis solo puede realizarse en blastocistos expandidos y precisa de cualidades técnicas muy exigentes.

Por lo tanto, entre estas dos técnicas no invasivas o mínimamente invasivas de obtención de ADN embrionario el análisis del ADN libre en medio de cultivo parece ser más prometedora y con una aplicación clínica más sencilla.

Si se comparan la técnica más utilizada actualmente que es la biopsia de TE con la que tiene mayor potencial de ser aplicada en un futuro que es el análisis de ADN libre en el medio de cultivo, se puede ver que ambas poseen ventajas y limitaciones. Las ventajas más evidentes proporcionadas por el análisis de es la no invasividad completa de esta técnica frente a una técnica muy invasiva como la biopsia de TE y los posibles daños que esta manipulación pudiera provocar en el embrión. Aun así, hay estudios que afirman que la biopsia de TE no tiene efectos sobre la implantación y podría afectar mínimamente a los resultados obstétricos y neonatales, sin embargo, hacen falta más estudios que confirmen estos efectos.

Por otro lado, la necesidad de equipamiento y personal especializado para la realización de la biopsia de TE con su consecuente curva de aprendizaje es un impedimento que el análisis de ALMC no presenta debido a que es una técnica fácil, rápida y segura que no necesita ningún tipo de equipamiento extra ni personal especializado.

Además, se ha visto que ni los diferentes medios ni materiales influyen en los resultados del análisis de ALMC. También se debería tener en cuenta que las células analizadas en la biopsia de TE solo representan una pequeña parte del embrión por lo que esto podría dar lugar a FP y FN en PGT-A debido al mosaicismo, en cambio, en el ALMC el origen del ADN podría ser tanto la MCI y como el TE dando información más amplia sobre el estatus genético del embrión completo.

Asimismo, no todos los embriones son biopsiables debido a que no todos tienen la calidad ni un número suficientes de células el en TE para poder ser biopsiados, en cambio, el medio de cultivo puede recogerse en cualquiera de los estadios embrionarios y siendo cualquiera la morfología del embrión permitiendo analizar el estatus genético de embriones que no se podrían haber biopsiado.

Entre las desventajas que presenta en análisis de ALMC frente a la biopsia de TE encuentran la falta de tasas de detección, amplificación y concordancia suficientemente buenas como para la aplicación clínica por lo que si se quisiera aplicar deberían mejorar estas tasas primero. Otra gran limitación es la procedencia aún desconocida del ALMC,

por lo que hasta que se dilucide su origen y el mecanismo por el cual se libera al medio será difícil su aplicación. Además, las mayores tasas de informatividad y concordancia se dan al analizar el ALMC de embriones cultivados hasta día 6 lo que podría afectar a la vitalidad y potencial de implantación si se mantuvieran todos los embriones 6 días, en cambio, la biopsia de TE puede realizarse siempre y cuando el embrión cumpla los criterios para poder ser biopsiado y no hay que mantenerlos en cultivo hasta día 6. El análisis de ALMC también presenta un alto riesgo de contaminación del medio de cultivo con sus consecuentes efectos en los resultados, riesgo no tan importante en la biopsia de TE en la que no se recoge el medio de cultivo.

Teniendo en cuenta todos los aspectos mencionados anteriormente se podría decir que el análisis de ALMC ofrece los beneficios de PGT invasivo evitando los efectos de la manipulación aportando información más completa del estatus genético del embrión. Además, se podría comenzar a utilizar combinado con la evaluación morfológica como biomarcador para priorizar embriones a transferir antes de su validación como método diagnóstico permitiendo la mejora de los resultados clínicos en ciclos de FIV.

CONCLUSIONES

Entre las técnicas invasivas de obtención de ADN embrionario analizadas en este trabajo la biopsia de TE presenta claros beneficios frente a la biopsia de blastómeros por lo que no es sorprendente que haya habido una clara transición de la biopsia de blastómeros hacia la biopsia de TE.

Entre las técnicas no invasivas presentadas, blastocentesis y el análisis de ALMC, la aproximación con mayores oportunidades y mayor potencial de aplicarse en un futuro es el análisis de ALMC debido a sus grandes ventajas frente a la blastocentesis.

El descubrimiento del ADN libre en el medio de cultivo ha supuesto un gran cambio a la hora de diseñar nuevas aproximaciones para la obtención de ADN embrionario para el PGT. Sin embargo, todavía queda tiempo para que el niPGT basado en el análisis de ALMC se pueda aplicar en la clínica ya que se tendrían que mejorar las tasas de detección, amplificación y concordancia y generar protocolos estandarizados para proceder de la misma forma en diferentes centros y así conseguir resultados comparables.

En conclusión, entre las cuatro técnicas analizadas en este trabajo la biopsia de TE es la mejor opción para aplicar en la actualidad debido a las limitaciones que presentan el resto de las técnicas. No obstante, en el momento que el análisis de ALMC consiga superar sus limitaciones tiene el potencial de sustituir la biopsia de TE y generar una aproximación no invasiva, fácil, rápida y segura para el PGT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? REPRODUCTION [Internet]. 2018;156:F29–50. Available from: <https://doi.org/10.1530/REP>
2. Hughes T, Bracewell-Milnes T, Saso S, Jones BP, Almeida PA, Maclaren K, et al. A review on the motivations, decision-making factors, attitudes and experiences of couples using pre-implantation genetic testing for inherited conditions. Vol. 27, Human Reproduction Update. Oxford University Press; 2021. p. 944–66.
3. Cimadomo D, Rienzi L, Capalbo A, Rubio C, Innocenti F, García-Pascual CM, et al. The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. Vol. 26, Human Reproduction Update. Oxford University Press; 2020. p. 453–73.
4. Firuza Rajesh P, Arundhati Sitaram A, Nandkishor Jagannath N, Dattatray Jayaram N, Rupesh Ramesh S, Prochi Fali M. Preimplantation genetic testings: Its evolution, where are we today? J Hum Reprod Sci. 2018;11(4):306–3014.
5. De Rycke M, Berckmoes V, De Vos A, De Voorde S Van, Verdyck P, Verpoest W, et al. Clinical experience of preimplantation genetic testing. Reproduction. 2020;160:A45–58.
6. Hou W, Shi G, Ma Y, Liu Y, Lu M, Fan X, et al. Impact of preimplantation genetic testing on obstetric and neonatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril [Internet]. 2021;116(4):990–1000. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.06.040>
7. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): The next revolution in reproductive genetics? Hum Reprod Update. 2020 Jan 1;26(1):16–42.
8. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. J Gynecol Obstet Hum Reprod [Internet]. 2020;49(5):101723. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101723>

9. Herramienta DAFO [Internet]. Available from:
<https://dafo.ipyme.org/Home#&&q=en-que-consiste>
10. Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2022;00(0):1–12. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.01.012>
11. Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, Celebi C, Cimadomo D, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT†. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):1–12.
12. Coll L, Parriego M, Boada M, Devesa M, Arroyo G, Rodríguez I, et al. Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: Comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. *Zygote*. 2018;26(3):191–8.
13. Zhao H, Tao W, Li M, Liu H, Wu K, Ma S. Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2019;299(5):1487–93. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05084-1>
14. Maggiulli R, Giancani A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human blastocyst biopsy and vitrification. *J Vis Exp*. 2019;(149):1–12.
15. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019;112(3):510–9.
16. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(28):14105–12.
17. Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, Poli M, Girardi L, Giancani A, et al. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*

[Internet]. 2018;110(5):870-879.e5. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.031>

18. Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2020;40(6):779–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.02.002>
19. Gombos K, Gálik B, Kalács KI, Gödöny K, Várnagy Á, Alpár D, et al. Ngs-based application for routine non-invasive pre-implantation genetic assessment in ivf. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):1–16.
20. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy and the Mystery of Genetic Material: A Review Article. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7).